



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA  
HOJA DE *Bixa orellana* L. SOBRE *Salmonella typhi* ATCC 167 COMPARADO  
CON AZITROMICINA**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
MÉDICO CIRUJANO

AUTOR:

CÉSAR AUGUSTO GALVÁN ESTACIO

ASESORES:

MGTR. DAVID RENE RODRÍGUEZ DÍAZ

MGTR. JAIME ABELARDO POLO GAMBOA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES

TRUJILLO – PERÚ

2019



**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA**

**PÁGINA DEL JURADO**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA HOJA DE *Bixa orellana* L. SOBRE  
*Salmonella typhi* ATCC 167 COMPARADO CON AZITROMICINA**

---

**DRA. CHIAN GARCÍA ANA MARÍA**

**PRESIDENTE DEL JURADO**

---

**MGTR. RODRÍGUEZ DÍAZ DAVID RENÉ**

**SECRETARIO DEL JURADO**

---

**DRA. LLAQUE SÁNCHEZ MARÍA ROCIO DEL P.**

**VOCAL DEL JURADO**

**TRUJILLO , MARZO DEL 2019**

## **DEDICATORIA**

A Dios, por permitirme llegar a cumplir una de mis metas, por ser la fortaleza en los momentos de aflicción, el amigo en los momentos de duda y el incondicional en los momentos de júbilo.

A mis padres, que por más distancia que nos pueda separar son la motivación, el ejemplo de superación, de perseverancia y el modelo de calidad humana sobre el que se cimienta mi persona.

A mis hermanos, quienes fueron cómplices de éste logro y son los hombros de quienes me apoyo.

**CÉSAR AUGUSTO GALVÁN ESTACIO**

## **AGRADECIMIENTO**

### **A mis maestros, asesores y guías**

Por toda la colaboración brindada durante la elaboración de ésta tesis, la Dra. Rocío Llaque, Dr. David Rodríguez y Mg. Blgo. Jaime Polo.

### **A mi Alma Mater la Universidad César Vallejo**

Por brindarme las herramientas necesarias para hacer frente en éste mundo competitivo, el conocimiento.

Gracias a todas las personas que me ayudaron de una forma directa e indirecta a la elaboración, desarrollo y culminación de ésta tesis.

**CÉSAR AUGUSTO GALVÁN ESTACIO**

## **DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD**

Yo, CÉSAR AUGUSTO GALVÁN ESTACIO con DNI N° 10403452 a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Medicina, declaro bajo juramento que toda la documentación que acompaño es veraz y auténtica.

Así mismo, declaro también bajo juramento que todos los datos e información que se presenta en la presente tesis son auténticos y veraces.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad César Vallejo.

Trujillo,      de Marzo del 2019

**CÉSAR AUGUSTO GALVÁN ESTACIO**

## PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: **“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA HOJA DE *Bixa orellana* L. SOBRE *Salmonella typhi* ATCC 167 COMPARADO CON AZITROMICINA estudio in vitro”**, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

**CÉSAR AUGUSTO GALVÁN ESTACIO**

## ÍNDICE

### PÁGINAS PRELIMINARES

Página del Jurado	i
Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Declaratoria de autenticidad	iv
Presentación	v
Índice	vi

### RESUMEN

vii

### ABSTRACT

viii

### I. INTRODUCCIÓN

01

1.1. Realidad problemática	01
1.2. Trabajos previos	01
1.3. Teorías relacionadas al tema	04
1.4. Formulación del Problema	07
1.5. Justificación del estudio	07
1.6. Hipótesis	08
1.7. Objetivos	08
1.7.1. Objetivo general	08
1.7.2. Objetivo específico	08

### II. METODO

09

2.1. Diseño de investigación y tipo de investigación	09
2.2. Variables y Operacionalización	10
2.3. Población, Muestra y Muestreo	12
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad	12
2.5. Método de Análisis de datos	13
2.6. Aspectos Éticos	13

### III. RESULTADOS

14

### IV. DISCUSIÓN

18

### V. CONCLUSIONES

21

### VI. RECOMENDACIONES

22

### VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

23

### ANEXOS

27

## RESUMEN

Se realizó un estudio experimental in vitro con el objetivo de evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de la hoja de *Bixa orellana* L. comparado con azitromicina a 5 µg, sobre cepas *Salmonella typhi* ATCC 167, en un estudio in vitro. Se realizaron cuatro diluciones del extracto etanólico (100%, 75%, 50% y 25%), azitromicina a 5 µg y un control neutro con DMSO; se realizaron 10 repeticiones por cada grupo de estudio. Se obtuvo que el extracto etanólico de *Bixa orellana* L. muestran halos de inhibición a partir de la dilución al 75 % (15.6 mm DS  $\pm$  2.1 IC 95% 14.1-17.1), al 100% el halo de inhibición fue de 18.1mm DS  $\pm$  1.5 IC 95% 17.0- 19.2, valores considerados como eficaces en relación al patrón del CLSI (>12 mm) pero no superan el halo de inhibición de azitromicina (28.5 mm, DS:  $\pm$  1.0 IC 95% 27.8 – 29.2). El análisis estadístico ANOVA indicó que los resultados del estudio fueron altamente significativos ( $p = 0.000$ ), al igual que la prueba de Tukey demostró que los grupos evaluados eran homogéneos y el grupo de azitromicina tenía mayor efecto antibacteriano. Se observa que a mayor concentración del extracto etanólico de la hoja de *Bixa orellana* L. el halo de inhibición aumenta. Se concluye que el extracto etanólico de la hoja de *Bixa orellana* L. tuvo efecto antibacteriano sobre cepas *Salmonella typhi* ATCC 167, pero menor que azitromicina, pudiéndose utilizar como un medicamento coadyuvante en el tratamiento de *Salmonella typhi*.

**Palabras claves:** Extracto etanólico, *Bixa orellana* L., *Salmonella typhi*, efecto antibacteriano.



## ABSTRACT

An experimental in-vitro study was carried out in order to evaluate the antibacterial effect of *Bixa orellana* L. leaf ethanol extract compared with azithromycin at 5 µg, on *Salmonella typhi* ATCC 167 strains, in an in-vitro study. Four dilutions of ethanol extract (100%, 75%, 50% and 25%), azithromycin at 5 µg and a neutral control with DMSO were performed; 10 repetitions were performed for each study group. The ethanol extract of *Bixa orellana* L. showed zones of inhibition from dilution at 75 % (15.6 mm SD  $\pm$  2.1 95% IC 14.1-17.1), at 100% the zone of inhibition was 18.1mm SD  $\pm$  1.5 95% IC 17.0- 19.2, values considered effective in relation to the CLSI pattern (>12 mm) but do not exceed the azithromycin zone of inhibition (28.5 mm SD:  $\pm$  1.0 95% IC 27.8 - 29.2). The ANOVA statistical analysis indicated that the study results were highly significant (p = 0.000), and Tukey-test showed that the evaluated groups were homogeneous and the azithromycin group had a greater antibacterial effect. It is observed that the higher the concentration of ethanol extract of *Bixa orellana* L. leaf, the greater the zone of inhibition. It is concluded that ethanol extract of *Bixa orellana* L. leaf had antibacterial effect on strains of *Salmonella typhi* ATCC 167, but less than azithromycin, such that it can be used as a complementary medicine in the treatment of *Salmonella typhi*.

**Keywords:** Ethanol extract, *Bixa orellana* L., *Salmonella typhi*, antibacterial effect.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA

Las enfermedades diarreicas agudas (EDA) son causa frecuente de fallecimiento en < de 5 años, son patologías prevenibles y tratables, pero generan una mortalidad de 760, 000 al año. En el orbe, cada año se reportan 1700 millones de casos <sup>1</sup>. África presenta más de 91 millones de pacientes con EDA, 137,000 muertes por año. En Asia Sudoriental se reportan 150 millones siendo 175,000 las muertes por año. <sup>1,2</sup> En Europa, 23 millones la adquieren y fallecen 5000. En América, 77 millones la contraen y 9,000 fallecen cada año <sup>2</sup>.

En el Perú, en el año 2015 se notificaron 158 230 casos de EDA con una tasa de 5.1/1000 hab., reportándose 7 defunciones en Cuzco, Loreto, Lima, Junín, Piura y Ancash. La tasa de incidencia de EDA más alta se registró en Moquegua con 10/1000; en La Libertad fue 6/1000 y la más baja correspondió a Puno con 1.6/1000, Lima registró 4/1000 habitantes<sup>3</sup>.

Existen alrededor de 31 agentes causales<sup>2</sup>, la mayoría de EDA se debe a etiología vírica y en las bacterianas destacan las *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella no typhi*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella typhi*, entre otras. <sup>3,4</sup> La salmonelosis, es una de las enfermedades diarreicas que ocurre por ingerir alimentos contaminados<sup>2,5</sup>. La *Salmonella typhi* de inicio gastrointestinal pasa a la sangre produciendo infección sistémica y complicaciones.<sup>6</sup> El tratamiento recomendado para fiebre tifoidea en casos de brotes epidémicos, alergia a antibióticos o resistencia probada de la *Salmonella typhi* es la azitromicina.<sup>7</sup> Su utilización indiscriminada e inadecuada, está condicionando la presencia de resistencia generando preocupación entre los profesionales de la salud <sup>8</sup>. La *Bixa Orellana* L (achiote), se emplea en medicina tradicional en casos de EDA, infecciones de piel, anti inflamatorio y diurético <sup>9</sup>. Existen diversos estudios científicos donde se reporta su actividad antibacteriana y fungicida.

### 1.2. TRABAJOS PREVIOS

**Alim S, et al (Bangadlesh, 2016)** examinaron el extracto de hojas y de semillas in vitro de Annatto (*Bixa Orellana* L) obtenidas en etanol al 95% para determinar la actividad antibacteriana utilizando los métodos de difusión en agar y dilución en tubo. El extracto (20 mg/ml) presentó acción antimicrobiana en ensayo contra dos cepas estándar de bacterias grampositivas, incluyendo

*Bacillus subtilis*, *Sarcinalutea* y cinco bacterias Gram negativas como la *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Proteus vulgaris*. Las zonas de inhibición obtenidas contra las bacterias en estudio fueron 14.5 mm para *Escherichia coli*, 13.5 mm para *Shigella dysenteriae*, 10 mm frente a *Proteus vulgaris*, 14mm para *Salmonella typhi* entre otras. Debemos resaltar que el efecto contra *Salmonella typhi* es el más significativo debido a la mayor resistencia frente a múltiples antibióticos comerciales. El extracto orgánico muestra significativamente notable actividad antibacteriana contra Gram positivos y Gram negativos (*E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. typhi* reportándose una MIC de 10mg/ml en éste último agente)<sup>10</sup>.

**De Araujo D. et al (Brasil, 2014)**, hicieron una revisión sistemática sobre el uso de *Bixa orellana* L. en el continente americano. Entre las veintiuna actividades ensayadas, el mayor número de estudios realizados fueron las relacionadas a la actividad antifúngica, la actividad antibacteriana, la actividad contra la malaria y la actividad mutagénica. La actividad citotóxica y la toxicidad han sido poco estudiados, con tres y dos estudios respectivamente. Su actividad farmacológica ha sido evaluada en modelos animales, modelos humanos, cultivos de células, y en vitro. Los extractos de hojas de achiote han sido evaluados para actividad antibacteriana frente a 8 cepas diferentes de bacterias: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, y *Staphylococcus epidermidis*, que no muestran actividad antibacteriana. Se encontró actividad moderada de los extractos de semillas contra *Plasmodium berghei* y *Plasmodium falciparum*<sup>11</sup>.

**Viuda M. et al (Colombia, 2012)**, determinaron el compuesto fenólico total (TPC), el compuesto flavonoide total (TFC), el contenido de bixina y norbixina de los extractos de hojas (ALE) y semilla (ASE), la actividad antioxidante de la ALE y la ASE mediante diferentes pruebas antioxidantes, y la eficacia de ALE y ASE en la inhibición del crecimiento de varias cepas bacterianas por acción de *Bixa orellana* L. Cinco diferentes sistemas de prueba se utilizaron para determinar la actividad antioxidante, mientras que el método de microdilución se utilizó para analizar la actividad antimicrobiana. El ALE presentó mayor TPC y TFC que ASE ( $P < 0,05$ ). En cuanto a la actividad antioxidante, en todas las concentraciones y con todos los métodos, las muestras evidenciaron una actividad antioxidante mayor ( $P < 0,05$ ) que las muestras de ASE. En cuanto a la actividad antibacteriana, la ASE fue un inhibidor más fuerte ( $P < 0,05$ ) de crecimiento de bacterias que ALE<sup>12</sup>.

**Tamil S. et al (India, 2011)** describieron el efecto del extracto metanólico de la hoja y semilla de

*Bixa orellana* L. a una concentración de 1000 µg / ml frente a cepas MTCC de *Salmonella typhi* ATCC 3216, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus fecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholera*, *Moraxella catarrhalis*, *Brucella sp*, *Acinetobacter sp*. y hongos como *Aspergillus niger*, *Candida Albicans*, y los dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* & *Trichophyton rubrum*. El extracto seco se disolvió en 0,25% Sulfóxido de dimetilo (DMSO, Merck®), el control positivo se realizó estreptomycin (10 µg / disco, Sigma®), mostrando una inhibición significativa, con la zona más alta: 18 ± 0,3 mm contra *Acinetobacter sp.*, *S. typhi*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*. Extracto de semilla *Bixa orellana* L fue comparativamente menos eficaz en la mayoría de los patógenos probados, excepto para *Brucella sp.* que se inhibió apreciablemente: 15 ± 0,1 mm. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de extracto de hoja se determinó como 15,62 µg/ml frente a *S. aureus* y 31,25 µg/ml para *K. Pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. fecalis* y *S. typhi*, en promedio<sup>13</sup>.

**Fleischer T. et al. (Ghana, 2002)** establecieron la actividad antimicrobiana de extractos etanólico de las hojas secas y semillas de *Bixa orellana* L frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Salmonella typhi* encontrando en ésta última una zona de inhibición de 17.00 mm en comparación a gentamicina 19.50 mm así demostrando un amplio espectro de actividad antimicrobiana siendo el extracto de las hojas el de mayor actividad ya descrita<sup>14</sup>.

**Medina D. (Perú, 2015)** evaluó el efecto citotóxico y antibacteriano de *Bixa orellana* L. sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*. Se prepararon dos extractos de metanol, a partir de las semillas y hojas. Se evaluó la actividad de los extractos utilizando el método de difusión en agar de placa de copa. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante el método de microdilución y la actividad citotóxica utilizando la línea celular MDCK (Madin Darby Canine. Kidney). Se observó un efecto antibacteriano más fuerte con el extracto metanólico de hojas con una zona de inhibición de 19,97 ± 1,31 mm frente a *S. mutans* y 19,97 ± 1,26 mm frente a *S. sanguinis*. El extracto de las semillas tuvo una actividad de 15,11 ± 1,03 mm y 16,15 ± 2,15 mm frente a *S. mutans* y *S. sanguinis*, respectivamente. Las CIM de la hoja y los extractos de semillas contra *S. sanguinis* fue de 62,5 y 125 µg / mL, respectivamente, y la CIM del extracto de hoja contra *S. mutans* fue de 62,5 µg / ml, y para el extracto de semilla fue de 31,25 µg / ml<sup>15</sup>.

**Espíndola R. (Perú, 2015)**, evaluó el efecto antifúngico del extracto etanólico de las hojas de *Bixa*

*orellana* L.a: 5% (50 mg/ml), 50% (500 mg/ml), 75% (750 mg/ml) y 100% (1000 mg/ml). Se utilizó el método de Kirby Bauer y la concentración inhibitoria mínima (CIM). Se expuso la *Candida* a cinco concentraciones del extracto, y se empleó un grupo control con fluconazol y otro con el inóculo microbiano con suero fisiológico; realizándose 10 repeticiones en cada caso. Se demostró el efecto antifúngico del extracto etanólico sobre *Candida albicans* siendo sensible a 50% y 75% con un diámetro promedio de los halos de 11.6 y 16.1 mm respectivamente, mientras que a concentración de 100% el diámetro promedio del halo fue 33.8, mostrando así un efecto semejante al fluconazol. La CIM para *Candida albicans* ATCC 10231 fue a concentración del 5% (50 mg/ml). Además utilizando las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y DUNCAN, se observó diferencia significativa entre las concentraciones del extracto sobre el crecimiento de *Candida albicans* ( $P < 0.05$ )<sup>16</sup>.

### 1.3. TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA

La *Salmonella typhi* se incluye en la familia Enterobacteriaceae, pertenece al grupo más numeroso y heterogéneo de bacilos Gram (-). Son microorganismos dispersos en el agua, el suelo y la vegetación, así como en la flora intestinal normal de diversos animales, incluido el hombre. Las infecciones por enterobacterias pueden proceder de un reservorio animal, de un humano ejemplo: *Shigella*, *S. tify* o de la diseminación endógena de los microorganismos en un paciente vulnerable afectando a diversas regiones del organismo. De acuerdo a su fisiología la *Salmonella typhi* es un bacilo gramnegativos anaerobios facultativos, sus requerimientos nutricionales son simples: fermentan la glucosa, reducen los nitratos, son oxidasa-negativos y catalasa-positivos. Su estructura presenta una membrana externa la cual predispone a la bacteria a la desecación, también presenta un lipopolisacárido el cual es el principal antígeno de la pared celular, un núcleo polisacárido y un lípido A (endotoxina)<sup>17</sup>

Actualmente la *Salmonella* se divide en dos especies la *Salmonella entérica* y la *Salmonella bongori* (antiguamente subespecie V), cada especie presenta múltiples subespecies y serotipos. La entérica contiene cinco subespecies: subespecie entérica (subespecie I); subespecie salamae (subespecie II); subespecie arizonae (subespecie IIIa); subespecie diarizonae (subespecie IIIb); subespecie houtenae (subespecie IV) y subespecie indica (subespecie VI). Casi todas las infecciones en el hombre son causadas por la subespecie I (*Salmonella entérica subespecie entérica*). Son cuatro los serotipos que producen fiebre entérica: *Salmonella Paratyphi A* (serogrupo A), *Salmonella Paratyphi B* (serogrupo B), *Salmonella Choleraesuis* (serogrupo C1) y *Salmonella Typhi* (serogrupo D). Presentan alrededor

de 150 antígenos somáticos O termolábiles (lipopolisacáridos, ubicados en la parte más externa); más de 100 antígenos K (capsulares) y más de 50 antígenos H (ubicados en los flagelos). Los antígenos capsulares K en *Salmonella typhi*, se denominan antígenos Vi.<sup>18</sup>

La fiebre tifoidea es producida por la *Salmonella typhi*<sup>18,19</sup>. La salmonela ingerida llega al intestino delgado, atraviesa en dirección a los linfáticos y luego a la circulación sanguínea.<sup>18</sup> Estas bacterias se multiplican en el tejido linfoide intestinal terminal, invadiendo y replicándose en las células M de los micropliegues localizadas en las placas de Peyer, para luego ser excretadas en las heces.<sup>19</sup> Luego de ser incubadas de 10 a 14 días, manifiestan fiebre, malestar, cefalea, bradicardia, estreñimiento, y mialgia. La elevación de la fiebre alcanza una meseta alta y se pueden presentar esplenomegalia y hepatomegalia. A menudo aparecen pigmentos de color de rosa, generalmente en la piel del tórax o abdomen.<sup>18</sup>

La fiebre tifoidea se manifiesta por alza térmica de varios días con mialgia, cefalalgia, artralgia, malestar general, anorexia, alteraciones del tránsito intestinal (diarrea o constipación) y hepato esplenomegalia. La enfermedad puede resultar en complicaciones como perforación intestinal, confusión mental, hemorragia y muerte. El agente se transporta por el agua y alimentos contaminados, así como por portadores como vía<sup>19</sup>. Cabe mencionar que el tratamiento farmacológico con antibióticos ha tenido una disminución en la tasa de mortalidad a menos de 1%.<sup>18</sup>

La resistencia intrínseca o mutacional es una característica de casi todas las especies de bacterias, las enterobacteriaceae no son ajenas a esta realidad, presentando resistencia a la bencilpenicilinas, los glucopéptidos, ácido fusídico, macrólidos (con algunas excepciones como la azitromicina la cual es muy eficaz in vivo para el tratamiento de la fiebre tifoidea), lincosamidas, rifampicina, linezolid y a las quinolonas con rapidez<sup>20</sup>.

La guía para el diagnóstico y tratamiento de la fiebre tifoidea en niños en el primer, segundo y tercer nivel en México, recomienda utilizar la azitromicina sólo en casos de brote epidémico de fiebre tifoidea, alergia a otros fármacos o en resistencia probada de *Salmonella typhi* a otros fármacos, menciona dosis de 10 mg/kg/día por vía oral, cada 24 horas por 7 días en pediátricos y 500 mg por vía oral cada 24 horas por 7 días en adultos<sup>7</sup>.

La *Salmonella typhi* es sensible a cloranfenicol, cotrimoxazol, tetraciclina y ceftriaxona. Mostrando susceptibilidad intermedia al ciprofloxacino, por mutaciones en gen gyrA (Ser83-Phe y Asp87-Asn) y

en el gen *gyrB* (Ser464-Phe). Evidencia de resistencia a quinolonas, antibiótico de elección para este germen. Otros fármacos para el manejo son ceftriaxona y azitromicina<sup>21</sup>.

La azitromicina es un derivado semisintético de la eritromicina, pertenece a la familia de los macrólidos, es un fármaco muy activo in vitro contra los cocos y los bacilos gram positivos, presenta actividad frente a *Salmonella typhi* como primera opción junto a la ceftriaxona y cefepizona.<sup>22</sup> Administrada vía oral se absorbe con rapidez y su distribución en el cuerpo es amplia excepto en el líquido cefalorraquídeo. Se unen a la subunidad ribosómica 50 S interfiriendo la síntesis proteica bacteriana.<sup>23</sup>

La *Bixa orellana* L. (dicotiledónea) es un arbusto que crece con mayor predominio en la región amazónica desde tiempos remotos.<sup>18,24</sup> Desde época precolombinas, hasta en la actualidad ha sido relevante por su uso en la elaboración de cosméticos, condimentos, medicamentos y en rituales religiosos.<sup>24,25</sup> Dentro de su gran variedad de nombres, podemos mencionar: acose, achote, achiolt, eroya chamgarica, foucou, katsha, lipstick tree, orellana, orlean, orleana, orleanstrauch, oroya, orocuaxiote, permacoa, pumacoa, rocou, rocouyer, sendri, urucu, urucum, urucuicero, uruku. El nombre común en nuestro medio es achiote.<sup>25</sup>

Se distribuye en varios departamentos del Perú, principalmente en Amazonas, Cuzco, Huánuco, Junín, Loreto, Madre de Dios, San Martín, Ucayali. Es un arbusto de aproximadamente 2 a 8 metros de altura, es originaria de la Amazonía y puede ser cultivado hasta los 1000 metros sobre el nivel del mar<sup>26</sup>.

Sus hojas son simples, presentan un peciolo corto, en forma de corazón, con un ápice acuminado y un borde cortado; son de color verde oscuro brillante, y su tamaño varía en relación a la clase de achiote. Su composición química, en particular las hojas muestran grandes concentraciones de saponinas, taninos y terpenos.<sup>25</sup>

Sus flores de color rosadas de bordes redondeados Los frutos en cápsulas que toman un color desde el rojo intenso hasta el naranja gracias a un revestimiento viscoso, con presencia de espinas, presenta forma ovoide, en su extremo puntiaguda, de mayor longitud que en el ancho.<sup>18,25</sup>

Un componente principal del achiote es la bixina, se encuentra en la semilla del fruto o capsula, constituye más del 80% de los pigmentos presentes, la bixina es la parte del colorante liposoluble y

la norbixina la parte hidrosoluble.<sup>25</sup> Dentro de sus principales componentes se mencionan una alta presencia de vitamina A (0.1%), B- caroteno y carotenoides como la bixina y norbixina, vitamina C (0.05%), flavonoides, proteínas, hierro, resina, aceites esenciales y alcaloides.<sup>12,20</sup>

En su uso cultural por propiedades medicinales por la población regional destacan su acción frente a infecciones bacterianas y parasitarias, dentro de sus propiedades farmacológicas destacan en las semillas propiedades antibacterianas frente a *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus*, *Salmonella typhi*, actividad antiespasmódica, hipoglicemizante, antiparasitaria y antiprotozoaria (*Plasmodium berghei*).<sup>26,27,28</sup> La hoja se emplean como colorante y por sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas también es usado como analgésico, contra infecciones de piel, antipirético, antihipertensivo y antidiarreico.<sup>27,28</sup>

#### **1.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

¿El extracto etanólico de la hoja de *Bixa orellana* L. tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167 comparado con azitromicina, estudio in vitro?

#### **1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

La presente investigación tiene relevancia teórica, social y económica debido al impacto que produce la salmonella tiphy como agente patógeno productor de infecciones intestinales de causa frecuente, en cuyo manejo se reporta un aumento de la resistencia al uso de antimicrobianos de uso común, por cuyo motivo se está recurriendo de manera constante a la búsqueda de alternativas eficaces y seguras las cuales provienen de recursos naturales, donde sus principios no causan reacciones indeseables. Bajo el conocimiento de la existencia de aceites esenciales y extractos con propiedades antisépticas y bactericidas de varias plantas oriundas de nuestra región, campo que por lo demás es poco explorado aunque si en muchos países del mundo; motivo por la que se hizo la presente investigación la cual buscó conocer las propiedades antibacterianas del extracto etanólico de la hoja de *Bixa orellana* L. y su acción sobre el crecimiento de la cepa de *Salmonella typhi* ATCC 167. Dentro de estas alternativas se evaluó si el extracto etanólico de la hoja de *Bixa orellana* L. tuvo efecto bactericida sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167 además se determinó la concentración mínima inhibitoria buscando de esta manera complementar un tratamiento específico que resulte de fácil acceso y a bajo costo frente a la infección por *Salmonella typhi* ATCC 167, al obtener resultados positivos la presente investigación contribuiría con el uso de este recurso natural para el tratamiento de infecciones producidas por salmonella tiphy.



## **1.6.- HIPÓTESIS**

H<sub>1</sub> El extracto etanólico de la hoja de *Bixa orellana* L. tiene efecto antibacteriano comparado con azitromicina sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167, estudio in vitro.

H<sub>0</sub> El extracto etanólico de la hoja de *Bixa orellana* L. no tiene efecto antibacteriano comparado con azitromicina sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167, estudio in vitro.

## **1.7.OBJETIVOS**

### **1.7.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto bactericida del extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* L."ACHIOTE" sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167 comparado con azitromicina, estudio in vitro.

### **1.7.2. OBJETIVO ESPECÍFICO**

1. Estimar el efecto bactericida del extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* al 25%.
2. Estimar el efecto bactericida del extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* al 50%.
3. Estimar el efecto bactericida del extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* al 75%.
4. Estimar el efecto bactericida del extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* al 100%.
5. Estimar el efecto bactericida de la azitromicina sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167.

## II. METODO

### 2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:

**TIPO DE INVESTIGACIÓN:** Básico.

**DISEÑO DE INVESTIGACION:** Experimental: de series de tiempo con repeticiones múltiples

#### EXPERIMENTO MULTIPLES REPETICIONES

RG1	X1	01
RG2	X2	02
RG3	X3	03
RG4	X4	04
RG5	X5	05
RG6	--	06

Donde:

R: Asignación al azar.

G: Placas Petri con *Salmonella typhi* ATCC 167.

X1: Dilución del extracto etanólico de *Bixa orellana* L. al 25%

X2: Dilución del extracto etanólico de *Bixa orellana* L. al 50%

X3: Dilución del extracto etanólico de *Bixa orellana* L. al 75%

X4: Dilución del extracto etanólico de *Bixa orellana* L. al 100%

X5: Tratamiento estándar con azitromicina

X6: Suero fisiológico/ DMSO (dimetilsulfóxido)

O: Las observaciones

## 2.2. VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN

### Identificación de variables:

- Variable Independiente: Tratamiento antibacteriano para *Salmonella typhi* ATC167.
  - a) No farmacológico: Extracto etanólico de la hoja de *Bixa orellana* L.
  - b) Farmacológico: azitromicina
  
- Variable Dependiente: Efecto antibacteriano.
  - a. Eficacia: Aumento del halo de inhibición  $\geq 12$  mm
  - b. No eficaz: Disminución del halo de inhibición,  $\leq 11$  mm

# Operacionalización de variables:

## Experimental

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
<b>Variable independiente:</b> Esquema de tratamiento antibacteriano para <i>Salmonella typhi</i> ATC167.	<p>Para el tratamiento de <i>Salmonella typhi</i> ATC167. Se utiliza:</p> <p>Tratamiento No farmacológico con el extracto de la hoja de <i>Bixa orellana</i> L.<sup>13</sup></p> <p>Tratamiento farmacológico con azitromicina<sup>7</sup>.</p>	<p>a) Dilución del extracto de <i>Bixa orellana</i> L. al 25 %; 75 % de DMSO</p> <p>b) Dilución del extracto de <i>Bixa orellana</i> L. al 50 %; 50 % de DMSO</p> <p>c) Dilución del extracto de <i>Bixa orellana</i> L. al 75 %; 25 % de DMSO</p> <p>d) Dilución del extracto de <i>Bixa orellana</i> L. al 100 %</p> <p>e) Azitromicina</p> <p>f) Suero fisiológico</p>	<p>a) RG1</p> <p>b) RG2</p> <p>c) RG3</p> <p>d) RG4</p> <p>e) RG5</p> <p>f) RG6</p>	Cualitativa nominal
<b>Variable Dependiente:</b> Efecto antibacteriano sobre <i>Salmonella typhi</i> ATC167.	<p>Relativo a una sustancia que destruye las bacterias o inhibe su crecimiento o reproducción.<sup>29</sup></p>	<p>Se medirá la distancia entre el borde externo del extracto etanólico y la línea final formada por el halo de inhibición. Según técnica de Kirby- Bauer M100S26 del CLSI.<sup>31</sup></p>	<p>Eficaz: <math>\geq 12</math> mm</p> <p>No eficaz: <math>\leq 11</math> mm</p>	Cualitativa nominal

### 2.3. POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

#### POBLACION:

Estuvo constituido por el conjunto de cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167 cultivadas en el Laboratorio Clínico “San José”, bajo condiciones controladas.

#### MUESTRA:

**Tamaño muestral:** por tratarse de un trabajo experimental, se empleó la formula estadística de diferencia de promedios sobre halos de inhibición, para el cálculo del número de placas que validen el diseño experimental.<sup>30</sup> (ANEXO 01)

**Unidad de análisis:** Cada una de las cepas de *Salmonella Typhi* ATCC 167

**Unidad de muestra:** Cada placa Petri de cultivo.

**Muestreo:** censal.

#### CRITERIOS DE SELECCIÓN:

##### Criterios de inclusión:

- Cepas estándar de *Salmonella typhi* ATCC 167.

##### Criterios de exclusión:

- Cepas contaminadas de *Salmonella typhi* ATCC 167.
- Cultivo de *Salmonella typhi* ATC167 más de 24 horas
- Cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167 que no pudiera ser restablecidos en medio de cultivo.

## 2.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD

### TÉCNICA:

Consistió en la observación directa del crecimiento de los microorganismos en la placa de Petri.

### PROCEDIMIENTO:

- a) Se hizo la identificación taxonómica de la planta de *Bixa orellana* L. en el Herbario Antenor Orrego - UPAO de Trujillo. (Ver anexo 02)
- b) Para la obtención del extracto etanólico de *Bixa orellana* L. se utilizó el método de maceración con etanol de 96° a partir del cual se hizo las diluciones. (Ver anexo 03)
- c) La cepa de *Salmonella typhi* ATC167 se cultivó en el medio agar Sabouraud Glucosado.
- d) La susceptibilidad del patógeno se evaluó según el método de disco de difusión de Kirby Bauer modificado<sup>15,32,33</sup>

### INSTRUMENTO:

Se utilizó la ficha de recolección de datos donde se registró los diámetros de los halos de inhibición para cada dilución de acuerdo con los criterios estándares M44-A2 y M60 del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se registra en la ficha: número de la placa, las diluciones, controles positivos y neutros y los respectivos halos de inhibición por cada dilución, reportando como efectivo si el halo es  $\geq 12$  mm, y no efectivo si es  $\leq 11$  mm.<sup>31</sup> (Ver anexo N°04)

### VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

El instrumento de recolección de datos fue validado por tres profesionales de salud (médico y biólogo), quienes evaluaron la ficha de recolección de datos y analizaron que cumpliera con recabar la información solicitada en la presente investigación

Método de experimentación y Microbiología ya está validados.<sup>34</sup> (ver anexo N°05)

## 2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos en los resultados fueron tabulados en el programa Microsoft Excel 2013 y se sometieron a pruebas estadísticas en el Software estadístico SPSS v23.0. Se analizó la modalidad de los datos recolectados mediante la prueba de Shapiro Wilk por tratarse de muestras pequeñas ( $<30$ ), además de la prueba de Levene para contrastar la homogeneidad de varianzas. Posterior a

ello y demostrándose que los datos no tienen un comportamiento normal se aplicó la prueba de Kruskal Walls además de complementarlo con medidas estadísticas descriptivas y un gráfico de boxplot para evidenciar el comportamiento de las zonas de inhibición al aplicar los distintos tratamientos. (Ver anexo 06)

## **2.6. ASPECTOS ÉTICOS:**

Se tomó en cuenta los protocolos de calidad del Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS), revisando los parámetros M2, M7, M23 y M100

## II. RESULTADOS

**Tabla 1:** Efecto bactericida del extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* L.” ACHIOTE” y azitromicina sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167, estudio in vitro.

### DATOS DESCRIPTIVOS DEL ESTUDIO

Diámetro del halo de inhibición									
Tratamiento	N	Media	95% de IC para la media		Me	DE	Mín	Máx	Rango IC
			LI	LS					
25 %	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
50 %	10	4.1	1.5	6.7	6.0	3.6	0.0	8.0	7.0
75 %	10	15.6	14.1	17.1	15.5	2.1	12.0	19.0	3.3
100 %	10	18.1	17.0	19.2	18.0	1.5	16.0	21.0	2.3
Azitromicina	10	28.5	27.8	29.2	28.0	1.0	27.0	30.0	1.3

DE=Desviación Estándar; Min=Mínimo; Máx=Máximo; Me = Mediana

Fuente: reporte de resultados del SPSS versión 25



**Tabla 2:** Efecto bactericida del extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* L." ACHIOTE" sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167 comparado con azitromicina, estudio in vitro

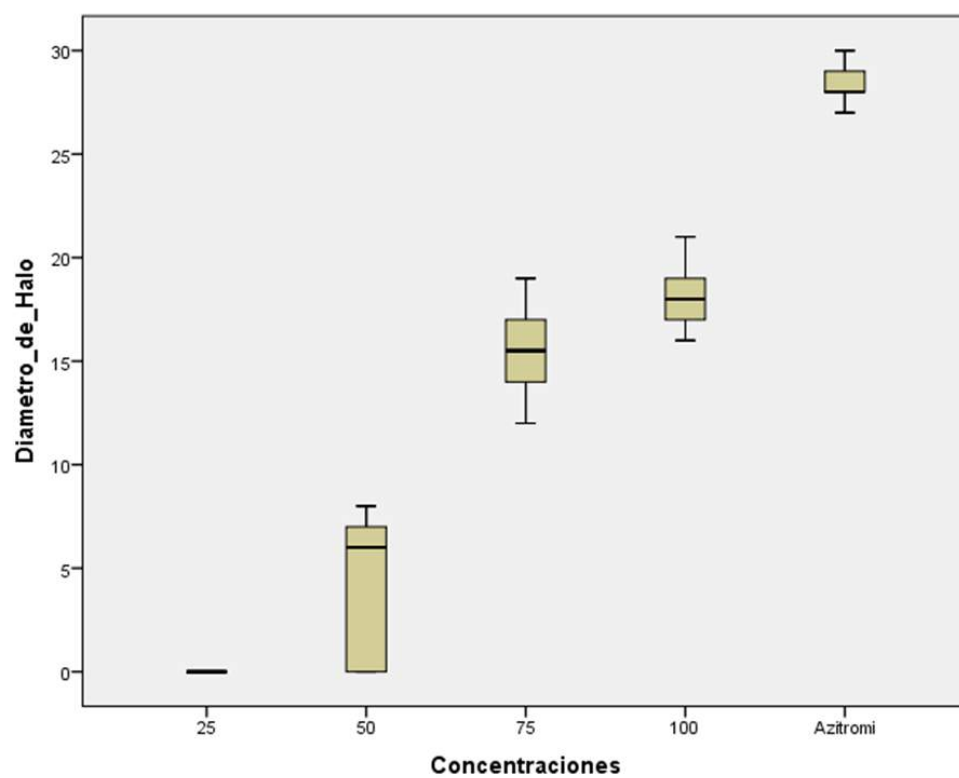
<b>ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)</b>					
	Suma	de	Media		
	cuadrados	gl	cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5208.9	4	1302.2	320.7	0.000
Dentro de grupos	182.7	45	4.1		
Total	5391.6	49			

Fuente: reporte de resultados del SPSS versión 25

**Tabla 3:** Post Anova T3 de Dunnett en el efecto bactericida del extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* L." ACHIOTE" sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167 comparado con azitromicina, estudio in vitro

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
25	10	0.0			
50	10		4.1		
75	10			15.6	
100	10			18.1	
Azitromicina	10				28.5
Sig.		1	1	0	1

Fuente: reporte de resultados del SPSS versión 25



Fuente: reporte de resultados del SPSS versión 25

**Grafico 01:** efecto bactericida del extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* L." ACHIOTE" sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167 comparado con azitromicina, estudio in vitro

#### IV. DISCUSIÓN

Con el objetivo de evaluar el efecto antibacteriano del etanólico de la hoja de *Bixa orellana* L. "Achiote" sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167. Comparado con azitromicina se desarrollo un estudio in vitro donde se observo 10 placas por grupo con un total de 50 cultivos. En cada placa Petri se colocaron un total de 5 discos de los cuales 4 de ellos representan el extracto etanólico de la hoja de *Bixa orellana* L. "Achiote" a distintas concentraciones (100%, 75%, 50%, 25%), tratamiento estandar con azitromicina y control negativo con suero fisiológico.

En la tabla 1, se observa las medidas de los diámetros de los halos de inhibición, como manifestación del efecto bactericida del extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* L. "ACHIOTE" y azitromicina sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167, donde encontramos que la concentración al 100% tuvo el halo de inhibición medio distante del control positivo equivalente a 18,1 mm, con una mínima de 16 mm y máxima de 21 mm, considerándolo que, si tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167 a pesar de no llegar a valores cercanos como la azitromicina, sin embargo, alcanzan aun valores satisfactorios según el CLSI (superiores a los 12mm) siendo eficaz en esta concentración. A la concentración 75%, el diámetro del halo de inhibición medio alcanzo a 15,6 mm, con una mínima de 12 mm y una máxima de 19 mm considerándose eficaz según el CLSI. A diferencia de las concentraciones de 50% y 25% se observaron valores promedio muy pequeños de halos de 4,1 y 00mm. En cuanto a la azitromicina tuvo una zona de inhibición medio de 28.5 mm, superior a las obtenidas por las cuatro concentraciones del extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* L. "ACHIOTE" considerándose ser sensibles (según CLSI  $\geq 12$  mm).

En el presente estudio se obtuvo resultados antibacterianos positivos frente a cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167; resultado mayor al encontrado por Fleischer T. et al<sup>14</sup> quienes mencionan una actividad antimicrobiana reportada con una zona de inhibición media de 17.00 mm reforzando de esta manera la confirmación y la alta sensibilidad del efecto antibacteriano (CLSI  $>12$ mm). Viuda M. et al<sup>12</sup> (Colombia, 2012), reporta también una actividad antibacteriana, mencionando que la ASE presenta un efecto inhibidor más fuerte ( $P < 0,05$ ) del crecimiento de bacterias que ALE (halo de inhibición 17 mm). Similares a los nuestros fueron los resultado descritos por Tamil S. et al<sup>13</sup> (India, 2011) con un halo de inhibición de 18.00 mm  $\pm$  0,3 mm de DS.

Los resultados difieren al estudio realizado por Alim S.<sup>10</sup> (Bangladesh, 2016) quien reporta una media de halo de inibicion de sólo 14 mm. De Araujo D. et al<sup>11</sup> (Brasil, 2014), reportó que el extracto

de *Bixa orellana* L. no mostró actividad antibacteriana. Probablemente esto se encuentre influenciado por la calidad del terreno y la altura en el cual la *Bixa Orellana* L. se desarrolla en el Perú potenciando de esta manera sus metabolitos primarios y secundarios brindando mayor potencia antibacteriana, incluso siendo efectiva contra bacterias gram positivas y hongos como lo menciona los trabajos realizados en Perú por Medina D.<sup>15</sup> (zona de inhibición de  $19,97 \pm 1,31$  mm frente a *S. mutans* y  $19,97 \pm 1,26$  mm frente a *S. sanguinis*) y Espíndola R.<sup>16</sup> (concentración al 100% el diámetro promedio del halo fue 33.8 frente a *Candida albicans*).

En la tabla 2. Considerando que las dimensiones de los halos de inhibición son normales como lo evidencia el anexo 06 se comparó las cuatro concentraciones del extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* L."ACHIOTE" y azitromicina sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167 evidenciando actividad antibacteriana de 15.6 en diluciones al 75% y de 18.1 al 100%, mediante el análisis de varianza ANOVA donde se obtuvo un valor de  $p = 0.0000$ , indicando que son altamente significativas las diferencias entre los grupos de experimentación. Fue necesario realizar la prueba Post ANOVA con el test de t3 de Dunnett porque las varianzas no fueron homogéneas (ver anexo 06) y permitió comprobar el efecto de las concentraciones sobre los promedios de los diámetros del halo de inhibición.

Los halos de inhibición por cada concentración se separan en 4 subconjunto de acuerdo a la eficacia que produjeron las concentraciones de extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* L." ACHIOTE" y azitromicina sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167 donde tienen diferencias significativas por tener  $p < 0,05$  tal como lo indica la tabla 3. En el gráfico 1, se puede visualizar estas diferencias, donde se observa que el extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* L." ACHIOTE" muestra acción antibacteriana pero que no supera a la azitromicina.

Por otro lado Tamil S. et al<sup>13</sup> (India, 2011) describe actividad antimicrobiana frente a cepas de *Salmonella typhi* ATCC 3216 a una concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de extracto de hoja de *Bixa Orellana* L. de 31,25 mg/ml en promedio<sup>13</sup>. Mientras que en el presente estudio se reporta actividad antibacteriana en un valor de 45 mg/ml en la dilución al 75% siendo aún mayor la actividad antibacteriana a una concentración de 60mg/ml en la dilución al 100% demostrando una fuerte actividad inhibitoria en el crecimiento de las cepas de *Salmonella typhi*. A concentraciones menores no se evidencia actividad antimicrobiana similar a lo descrito por Alim S. et al<sup>10</sup> quien reporta nula actividad antimicrobiana a una MIC de 10 mg/ml.

## V. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* L."ACHIOTE" evidenció tener efecto bactericida sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167 a mayores concentraciones pero no supera la eficacia antibacteriana de la azitromicina.
- El extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* L."ACHIOTE" tuvo un halo de inhibición de 18.1 mm al 100%.
- El extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* L."ACHIOTE" tuvo un halo de inhibición de 15.6 mm al 75%.
- El extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* L."ACHIOTE" en las concentraciones del 25 y 50% no se evidenció halo de inhibición.
- La azitromicina sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167 obtuvo un halo de inhibición de 28.5 mm.

## VI. RECOMENDACIONES

- Se puede ampliar el estudio combinando el extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* L."ACHIOTE" con azitromicina para potenciar el mayor efecto antibacteriano.
- Se puede estudiar otras formas del extracto de la hoja *Bixa orellana* L."ACHIOTE" correlacionando su actividad frente a otras bacterias gram negativas, actividad sobre bacterias gram positivas y hongos
- Se sugiere evaluar el efecto del extracto etanólico de la hoja *Bixa orellana* L."ACHIOTE" sobre *Salmonella typhi*, en modelos roedores.
- Investigar sobre los métodos de aislamiento y purificación de los metabolitos primarios y secundarios del extracto de la hoja *Bixa orellana* L."ACHIOTE" para su inclusión en productos alimenticios y/o farmacéuticos.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. (2017). *Enfermedades diarreicas* [en línea] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/> [Consultado el 09 de abril de 2017].
2. Organización Mundial de la Salud. (2017). *Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria.* [en línea] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/es/> [Consultado el 09 de abril de 2017].
3. Dge.gob.pe. (2018). [en línea] *Situación epidemiológica de las Enfermedades Diarreicas Agudas (EDA) en el Perú. 2015.* Pág. 142 – 145. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2015/07.pdf> [Consultado 2017 Abr 09].
4. Essalud.gob.pe. (2017). [en línea]. *Guía práctica clínica diarrea disentérica en la niña y el niño.* Disponible en: [http://www.essalud.gob.pe/downloads/guias\\_emergencia\\_epidemiologica/guias\\_EDAs\\_IRAs.pdf](http://www.essalud.gob.pe/downloads/guias_emergencia_epidemiologica/guias_EDAs_IRAs.pdf) [Consultado el 09 de abril de 2017].
5. Dge.gob.pe. (2017). [en línea]. *Enfermedades Transmitidas por Alimentos, una importante causa de morbilidad en nuestro País* Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/boletines/2012/50.pdf> [Accedido el 09 de abril de 2017].
6. Médecins Sans frontieres. *Guía clínica y terapeutica.* [internet] Edición 2016. [Consultado 2017 Abr 09] Disponible en: [http://refbooks.msf.org/msf\\_docs/sp/clinical\\_guide/cg\\_sp.pdf](http://refbooks.msf.org/msf_docs/sp/clinical_guide/cg_sp.pdf)
7. *Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y Tratamiento para la Fiebre Tifoidea.* Ciudad de Mexico. Instituto mexicano del seguro social, 2016. Disponible en: [http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/259\\_GPC\\_FIEBRE\\_TIFOIDEA/Fiebre\\_tifoidea\\_RR\\_CENETEC.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/259_GPC_FIEBRE_TIFOIDEA/Fiebre_tifoidea_RR_CENETEC.pdf) .[Consultado 09 Abr 2017]
8. Velásquez R, Torres N, Horna G, Pando J, Castillo M, Hernández R. et al. *Sensibilidad antibiótica de Streptococcus pneumoniae en portadores nasofaríngeos en niños sanos menores de un año en Lima, Perú.* Acta méd. Peruana [Internet]. 2008 Jul [citado 2017 abril 09]; 25(3): 148-152. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S172859172008000300005Ing=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172859172008000300005Ing=es).



9. Radilla O, asignatura de Medicina Tradicional, *Propiedades y usos medicinales de achiote (Bixa orellana)*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 2012. [Consultado 2017 Abr 09] Disponible en: :  
[http://www.tlahui.com/educa/comunidad/tesinas/herbolaria\\_achiote\\_bixa\\_orellana.pdf](http://www.tlahui.com/educa/comunidad/tesinas/herbolaria_achiote_bixa_orellana.pdf)
10. Alim S, Bairagi N, Shahriyar S, Kabir M, Rahman M. (2016). In vitro antibacterial potential of Bixa orellana L. against some pathogenic bacteria and comparative investigation on some standard antibiotics [artículo científico] Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 5. 178-181. [publicado: 2016. Citado: 07/02/2018] disponible en:  
[https://www.researchgate.net/publication/299597965\\_In\\_vitro\\_antibacterial\\_potential\\_of\\_Bixa\\_orellana\\_L\\_against\\_some\\_pathogenic\\_bacteria\\_and\\_comparative\\_investigation\\_on\\_some\\_standard\\_antibiotics](https://www.researchgate.net/publication/299597965_In_vitro_antibacterial_potential_of_Bixa_orellana_L_against_some_pathogenic_bacteria_and_comparative_investigation_on_some_standard_antibiotics)
11. De Araújo D, De Araujo M, Accioly T. "Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa orellana* L.: A Review," The Scientific World Journal, vol. 2014, Article ID 857292, 11 pages, 2014. Brasil. [publicado; 2014. Consultado 2017 Abr 19]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/857292/>
12. Viuda M, Gómez C, Quintana J, Alarcón J, Zapata J. *In vitro antioxidant and antibacterial activities of extracts from annatto (Bixa orellana L.) Leaves and seeds*. JFSH. 2012 [Consultado 2017 Abr 19]. Pag. 399–406. Disponible en:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4565.2012.00393.x/abstract>
13. Tamil A, Dinesh M, Satyan R, Chandrasekaran B, Rose C. *Leaf and Seed extracts of Bixa orellana L. exert anti-microbial activity against bacterial pathogens*. JAPS. 2011. [Consultado 2017 May 19]. Pag. 116-120. Disponible en:  
[http://japsonline.com/admin/php/uploads/273\\_pdf.pdf](http://japsonline.com/admin/php/uploads/273_pdf.pdf)
14. Fleischer T, Ameade E, Mensah M, Sawyer I. (2002). Actividad antimicrobiana de las hojas y semillas de *Bixa Orellana* [artículo científico]. Elsevier Science. 74 (2003) 136-138. [publicado: 2002. Citado: 07/02/2018] disponible en:  
<https://translate.google.com/translate?hl=es&sl=en&u=https://eurekamag.com/pdf/003/003647486.pdf&prev=search>
15. Medina D. *Evaluación in vitro del efecto antibacteriano y citotóxico del extracto metanólico de Bixa orellana L. (achiote) sobre cepas de Streptococcus mutans (ATCC 25175) y Streptococcus sanguinis (ATCC 10556)*. [tesis en internet] universidad privada de ciencias aplicadas. 2015. [Lima – Peru]. [Citado 2017 May 09]. Disponible en:  
<http://repositorioacademico.upc.edu.pe/upc/bitstream/10757/584214/1/original.pdf.pdf>

16. Espíndola R. *Efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de las hojas de Bixa orellana L. "Achiote" sobre Candida albicans ATCC 10231*. [Tesis en internet]. Universidad Privada Antenor Orrego. [Trujillo-Perú]. 2015. [Citado 2017 May 09]. Disponible en: [http://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/upaorep/1736/1/RE\\_MED.HUMANA\\_BIXA.ORELLANA.L\\_FLUCONAZOL\\_CANDIDA.ALBICANS\\_TESIS.pdf](http://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/upaorep/1736/1/RE_MED.HUMANA_BIXA.ORELLANA.L_FLUCONAZOL_CANDIDA.ALBICANS_TESIS.pdf)
17. Murray P, Rosenthal K, Pfauer M. *Microbiología medica* [internet] España. Editorial Elsevier 5ta ed. 2014. [revisado: 2006, Consultado 2017 May 09] Pags. 312-321. Disponible en: [https://parabolasdocotidiano.files.wordpress.com/2011/10/microbiologia\\_murray.pdf](https://parabolasdocotidiano.files.wordpress.com/2011/10/microbiologia_murray.pdf)
18. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T. Jawetz, Melnick, Adelberg *Microbiología médica* [internet] Mexico. Mc Graw Hill 25° ed. [revisado: 2011; Consultado 2017 May 09]. Pags. 217-219 Disponible en: [http://redlagrey.com/files/Microbiologia\\_Medica\\_Jawetz\\_25\\_www.rinconmedico.smffyc.com.pdf](http://redlagrey.com/files/Microbiologia_Medica_Jawetz_25_www.rinconmedico.smffyc.com.pdf)
19. Oliveira C, Vulcão L, Lopes M. *Resistencia antimicrobiana de Salmonella Typhi identificadas en el Estado de Pará, Brasil*. Rev Pan-Amaz Saude [internet] 2010 [Consultado 2017 May 09]. Pag. 61-65. Disponible en: [http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/rpas/v1n2/es\\_v1n2a07.pdf](http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/rpas/v1n2/es_v1n2a07.pdf)
20. Gilbert D. *Guía Sanford de terapéutica antimicrobiana*. 46° Ed. 2016. Pag. 50-56.
21. García R, Lejon V, Horna G. *Intermediate susceptibility to ciprofloxacin among Salmonella entericaserovar Typhi isolates in Lima, Peru*. J Clin Microbiol [internet] 2014. [Consultado 2017 Abr 17]. v52 (3).Pág.968-970. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3957797/>
22. Velasco A, Del Valle A. *Farmacología clínica y terapéutica médica*. 1era edición. España. Editorial Mc Graw-Hill. 2004. Pags. 169-170
23. Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman y Gilman. *Bases Farmacológicas de la Terapéutica* [internet] España. Mc Graw Hill. 2006. [revisado: julio 2005, Consultado 2017 Abr 17] Disponible en: <https://oncouasd.files.wordpress.com/2015/06/goodman-farmacologia.pdf>
24. Campos J. *"Identificación, Caracterización y Comportamiento ante principales enfermedades en ocho morfotipos de Bixa Orellana "ACHIOTE", en Zúgarococha*. [Tesis en internet] Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. [Iquitos-Perú] 2014. [Citado 2017 May 10] Disponible en: <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/UNAP/3326>
25. Bonilla J. *Manual del cultivo de achiote*. Nicaragua. 2009. [Consultado 2017 May 10] Disponible en: <http://cenida.una.edu.ni/relectronicos/RENF01B715mc.pdf>
26. Pierre J. *manual de plantas medicinales del altiplano*. Editorial Médicos descalzos. Guatemala. 2013 [Consultado 2017 May 06] Disponible en:

<http://www.jardinsdumonde.org/wp-content/uploads/2016/03/MANUAL-DE-PLANTAS-MEDICINALES-GUATEMALA-JDM.pdf>

27. Salaverry O, Cabrera J. *Florística de algunas plantas medicinales*. RPMESP. [internet] 2014. [Consultado 2017 May 06] v 31(1). Pag.165-168. Disponible en: <http://www.rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/25/2014>
28. Mendocilla M, Villar M. *Manual de Fitoterapia*. [Consultado 2017 May 10] Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/cap7.pdf>
29. Diccionario Médico Mosby (7<sup>a</sup> ed.). (2005). St. Louis, MO: Mosby. Pag. 76
30. Dawson R, Beth D, Trapp R. Bioestadística médica. 3era ed. Editorial Manual moderno. 2002. Pags. 32-38.
31. CLSI. Catalog Supplement. USA. 26th ed. 2016. [internet] [Consultado 2017 Abr 29]. Disponible en : [http://www2.valtek.cl/cgi-bin/procesa.pl?plantilla=/v2/archivo.html&id\\_archivo=963&download=1](http://www2.valtek.cl/cgi-bin/procesa.pl?plantilla=/v2/archivo.html&id_archivo=963&download=1)

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 01

$$n = \frac{\left(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta}\right)^2 2\sigma^2}{\left(\bar{X}_1 - \bar{X}_2\right)^2}$$
$$n = \frac{(1.96 + 0.84)^2 2(2.15)^2}{(12 - 16.15)^2}$$

$$n = 4.2$$

$$n = 5$$

Dónde:

- $Z_{\alpha/2} = 1.96$  Para un nivel de confianza del 95%
- $Z_{\beta} = 0.84$  para una potencia de prueba del 80%
- $\sigma^2 = \pm 2.15^{15}$
- $X_1 = 12 \text{ mm}^{31}$
- $X_2 = 16.15 \text{ mm}^{15}$

## ANEXOS 02

### CERTIFICACION DE LA PLANTA



**UPAO**

Museo de Historia Natural y Cultural

#### HERBARIO ANTENOR ORREGO (HAO)

#### CONSTANCIA N° 02-2019-HAO-UPAO

El que suscribe, Director del Museo de Historia Natural y Cultural de la Universidad Privada Antenor Orrego, deja:

#### CONSTANCIA

Que **César Augusto Galván Estacio**, estudiante de la carrera profesional de Medicina Humana de la Universidad César Vallejo, ha solicitado la determinación de material vegetal, el cual corresponde a la siguiente especie:

*Bixa orellana* L. (Bixaceae)

El mismo que será utilizado para la tesis titulada: "Efecto antibacteriano del extracto etanólico de la hoja de *Bixa orellana* (achiote) sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167 comparado con azitromicina".

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que correspondan.

Trujillo, 29 de enero de 2019



  
**Mg. Segundo Leiva González**  
Director

Museo de Historia Natural y Cultural

## ANEXO 03

### PROCEDIMIENTO

#### 1. Tratamiento de la muestra

Las hojas frescas de *Bixa orellana* L. "ACHIOTE", se obtuvieron en el mercado zonal Palermo de Trujillo, procedentes de la localidad de de Pucará, provincia de Jaén departamento de Cajamarca, en una cantidad de 4 Kg aproximadamente y se llevaron al laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo, donde se seleccionaron los ejemplares con buenas condiciones. Las hojas se lavaron con agua corriente y después con agua destilada clorada. Se colocaron sobre papel absorbente y se cortaron en mitades, las cuales se sacaron y colocaron en una bandeja de cartulina. Se llevó al horno a deshidratar a 40-45°C por 48 horas. Después, se trituró en un procesador de alimentos Oster hasta que se obtuvo partículas muy pequeñas y se reservó almacenándolo herméticamente en una bolsa negra.



#### 2. Obtención del extracto etanólico

El extracto etanólico de *Bixa orellana* L. se obtuvo por el método de maceración en etanol de 96°; para ello, se colocó en un frasco de vidrio 20 g de la muestra deshidratada y triturada y

100 ml de etanol, se tapó el frasco herméticamente y se cubrió totalmente con papel aluminio. Luego, se dejó en lugar fresco y seco, a temperatura ambiente, por 8 días con agitación de 3 a 4 veces diarias. Después, se hizo una doble filtración. Primero se filtró a través de una gasa estéril y segundo a través de un papel filtro Whatman Nº41. Este filtrado, se evaporó por ventilación con corrientes de aire frío en circuito cerrado en estufa, por 1 a 2 días, hasta que quedó a una concentración mayor a 163 mg/mL (Anexo 07). De este modo, se obtuvo el extracto etanólico (EE) considerado al 100%; el cual, se reservó en un frasco de vidrio ámbar a 4°C–6°C hasta su utilización.





### 3. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó agar Sabouraud Glucosado como medio de cultivo. Se preparó suficiente medio para 10 placas Petri. Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió en Placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que solidificó completamente.

### 4. Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión en agar)

Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tomó en cuenta los estándares M44-A2 y M60.

#### 1. Preparación del inóculo

- a. El inóculo se preparó colocando 2-3 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo *Salmonella typhi* ATCC 167., cultivado hace 24 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml aprox.)





## 2. Siembra del microorganismo

- a. Se sembró el microorganismo, *Salmonella typhi* ATCC 167, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.



## 3. Preparación de las concentraciones del EE

- a. A partir del EE, se prepararon 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como solvente Dimetil Sulfoxido (DMSO); para ello, se rotularon 4 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 4 concentraciones y se colocó 750  $\mu$ L de EE y 250  $\mu$ L de DMSO al tubo de 75%, 500  $\mu$ L de EE y 500  $\mu$ L de DMSO al tubo de 50%, y 250  $\mu$ L de EE y 750  $\mu$ L de DMSO al tubo de 25%.

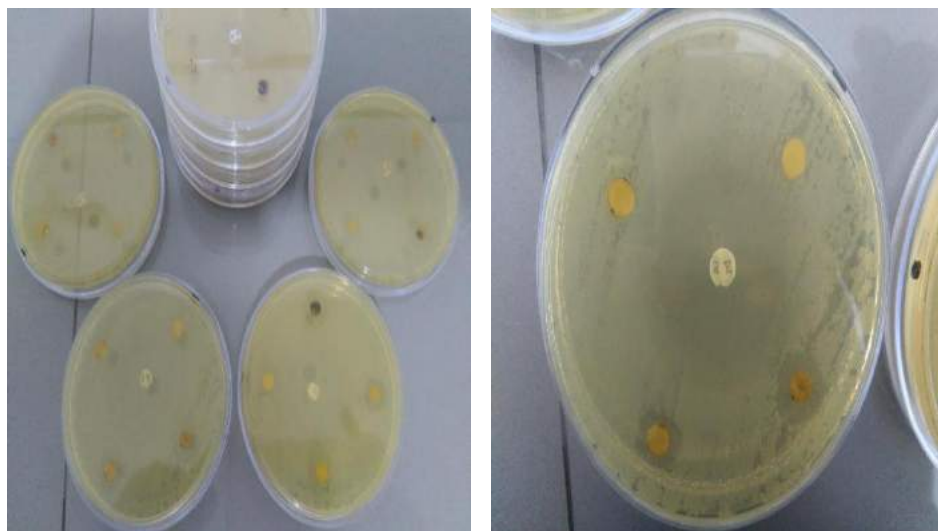


#### 4. Preparación de los discos de sensibilidad con EE

- a. A partir de cada una de las concentraciones, se colocó 10  $\mu$ L en cada disco de papel filtro Whatman N° 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomó 10  $\mu$ L de EE al 25% y se colocó en un disco, 10  $\mu$ L de EE al 50% en otro disco, 10  $\mu$ L de EE al 75% en otro disco y 10  $\mu$ L de EE al 100% en otro disco. Esto se repitió por 10 veces.

#### 5. Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano

- a. Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con EE, y se colocaron en la superficie del agar sembrado con el microorganismo *Salmonella typhi* ATCC 167, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con azitromicina (control positivo). Se dejaron en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 18-20 horas.



## 6. Lectura e interpretación

- a. La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizó para cada una de las concentraciones de EE de *Bixa orellana* L. y para el azitromicina. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M100 del CLSI.

## 7. Manejo y eliminación del material contaminado y desechos.

Fundamento: La gestión de residuos debe ser considerada como una parte muy importante de la bioseguridad. La mejor manera de racionalizar los residuos es mediante una gestión integrada cuyos pilares básicos son la minimización, la segregación y la eliminación controlada (disposición).

Las formas más frecuentes de tratamiento de los residuos sólidos son la incineración y la esterilización por autoclave.

### **Manejo en el lugar de generación**

- a. Los desechos fueron colocados directamente en bolsas especiales en el momento de su generación, por lo tanto éstas tuvieron que estar ubicadas en el lugar donde se brinda la atención.
- b. La bolsa fue colocada dentro de un recipiente, cubriendo completamente el borde del mismo, con un doblez de por lo menos 10 cms de longitud.

#### Anexo 04

**Tabla 1.** Diámetro de halos de inhibición en cultivos de *Salmonella Typhi* ATCC 167, según agente antibacteriano

#### FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

ZONA DE INHIBICIÓN (mm)						
Nº	Extracto etanólico de Achiote				Azitromicina	DMSO
	100%	75%	50%	25%		
1	18	15	7	0	29	0
2	18	14	0	0	28	0
3	17	12	8	0	29	0
4	19	15	7	0	30	0
5	18	17	6	0	28	0
6	21	18	6	0	28	0
7	17	16	0	0	28	0
8	16	16	0	0	27	0
9	20	19	7	0	28	0
10	17	14	0	0	30	0

## Anexo 05

### VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

#### Anexo 05

#### VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

ÍTEM	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ESPECÍFICOS							
	CONTENIDO (Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)		CONSTRUCTO (Hasta donde el instrumento mide realmente la variable, y con cuanta eficacia lo hace)		RELEVANCIA A (El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)		COHERENCIA INTERNA (El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo)		CLARIDAD (El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)		SUFICIENCIA (Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1	X		X		X		X		X		X	
2												
3												

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS GENERALES				SI	NO	OBSERVACIÓN
El instrumento contiene instrucciones claras y precisas para responder la ficha de cotejos				X		
Los ítems permiten el logro del objetivo de la investigación				X		
Los ítems están distribuidos en forma lógica y secuencial				X		
El número de ítems es suficiente para recoger la información. En caso de ser negativa la respuesta sugiera los ítems a añadir				X		
VALIDEZ						
APLICABLE		NO APLICABLE		APLICABLE	TENIENDO EN CUENTA	OBSERVACIÓN

Instrumento validado por:

Firma y sello  
Jaime A. Polo Gamboa  
MICROBIOLOGO  
CBP 8251

Firma y sello  
DAVID GARCÍA CEDRÓN  
MICROBIOLOGO  
CBP. 5827

Firma y sello  
Germel B. Chávez Rimarachi  
MEDICINA INTERNA  
CMP 39834 RNE

37

## ANEXO 06

### MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

#### Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente:							
						Intervalo de confianza	
			Diferencia	Error		Límite	Límite
(I) Concentraciones			de medias	estándar	Sig.	inferior	superior
			(I-J)				
T3	25	50	-4,100*	1.130	0.045	-8.11	-0.09
Dunnett		75	-15,600*	0.653	0.000	-17.92	-13.28
		100	-18,100*	0.482	0.000	-19.81	-16.39
		azitromicina	-28,500*	0.307	0.000	-29.59	-27.41
	50	25	4,100*	1.130	0.045	0.09	8.11
		75	-11,500*	1.305	0.000	-15.74	-7.26
		100	-14,000*	1.228	0.000	-18.10	-9.90
		azitromicina	-24,400*	1.171	0.000	-28.43	-20.37
75	25	15,600*	0.653	0.000	13.28	17.92	
	50	11,500*	1.305	0.000	7.26	15.74	
	100	-2.500	0.812	0.062	-5.08	0.08	
	azitromicina	-12,900*	0.722	0.000	-15.29	-10.51	
100	25	18,100*	0.482	0.000	16.39	19.81	
	50	14,000*	1.228	0.000	9.90	18.10	
	75	2.500	0.812	0.062	-0.08	5.08	
	azitromicina	-10,400*	0.572	0.000	-12.24	-8.56	
azitromicina	25	28,500*	0.307	0.000	27.41	29.59	
	50	24,400*	1.171	0.000	20.37	28.43	
	75	12,900*	0.722	0.000	10.51	15.29	
	100	10,400*	0.572	0.000	8.56	12.24	

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Reporte de resultados SPSS versión 25

#### Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov <sup>b</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
var 2	0.303	10	0.010	0.745	10	0.311
var 3	0.123	10	,200*	0.981	10	0.971
var 4	0.226	10	0.158	0.929	10	0.441
var 5	0.297	10	0.013	0.868	10	0.095

#### Prueba de homogeneidad de varianzas test de levene

Diametro_Medio_de_Halo			
Estadístico de			
Levene	gl1	gl2	Sig.
22.244	4	45	0.000

Determinación de la concentración del extracto etanólico de la hoja de *Bixa orellana* L.

- **Pesos de Luna de Reloj (LR) y Extracto Seco (ES)**
- LR1 = 9,40g      LR1+ES1 = 9,48g      ES1 = 0.05g = 80mg
- LR2 = 9,40g      LR2+ES2 = 9.43g      ES2 = 0.03g = 30mg
- LR3 = 9,36g      LR3+ES3 = 9.43g      ES3 = 0.07g = 70mg
- PROMEDIO = 60mg/mL
- **Concentración al 100% = 60mg/mL**
- **Concentración al 75% = 45mg/mL**
- **Concentración al 50% = 30mg/mL**
- **Concentración al 25% = 15mg/ML**

## ANEXO 07

### CONSTANCIA DE ASESORAMIENTO DE TESIS



#### CONSTANCIA DE ASESORÍA DE TESIS

El que suscribe Mg. JAIME ABELARDO POLO GAMBOA Docente de la Facultad de Ciencias Médicas, Escuela Académico Profesional de Medicina.

#### Da CONSTANCIA:

Que, de conformidad con el Reglamento para elaboración y evaluación de Proyectos de Tesis para obtener el Título Profesional Médico Cirujano, el alumno: Galván Estacio César Augusto, de esta casa de estudios, trabajó bajo mi asesoramiento el Proyecto de Tesis titulado: "Efecto antibacteriano del extracto etanólico de la hoja de *Bixa orellana* (achiote) sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167 comparado con azitromicina" que será presentado para optar el Título anteriormente mencionado.

En tal virtud, asumí el asesoramiento de dicho proyecto, en calidad de Asesor TÉCNICO, tarea voluntaria y de cooperación académica con la Escuela de Medicina.

Expedido el presente a solicitud de la parte interesada para los fines académicos que estime conveniente, en la Ciudad de Trujillo a los 30 días del mes de setiembre de del 2018.



Jaime A. Polo Gamboa  
MICROBIOLOGO  
C.R.P. 8951



## ANEXO 08

### CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE TESIS

**San Jose**  
LABORATORIO CLINICO  
*Calidad y profesionalismo el servicio de tu salud*

**CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO**

El Laboratorio “San José” deja constancia que ha prestado sus instalaciones, en donde el Sr. CÉSAR AUGUSTO GALVÁN ESTACIO estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado “Efecto antibacteriano del extracto etanólico de la hoja de *Bixa orellana* “achiote” sobre cepas de *Salmonella typhi* ATCC 167 comparado con azitromicina”, durante los días 28 de agosto al 2 de setiembre de 2018, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud del estudiante, sólo para fines académicos, a los 10 días del mes de setiembre de 2018.

  
José Luis Callo Quevea  
BIOLOGO - MICROBIOLOGO  
C.B.P. 0301

**Sede Principal: Francisco Bolognesi 678 Of. 203 - Centro Histórico - Trujillo**  
**Sucursales: Los Corales 277- Barrio Médico Urb. Santa Inés - Trujillo**  
☎ 769999 - ☎ 948649844

## ANEXO 09

### CONSTANCIA DE ABSTRACT



#### ABSTRACT

An experimental in-vitro study was carried out in order to evaluate the antibacterial effect of *Bixa orellana* L. leaf ethanol extract compared with azithromycin at 5 µg, on *Salmonella typhi* ATCC 167 strains, in an in-vitro study. Four dilutions of ethanol extract (100%, 75%, 50% and 25%), azithromycin at 5 µg and a neutral control with DMSO were performed; 10 repetitions were performed for each study group. The ethanol extract of *Bixa orellana* L. showed zones of inhibition from dilution at 75 % (15.6 mm SD  $\pm$  2.1 95% IC 14.1-17.1), at 100% the zone of inhibition was 18.1mm SD  $\pm$  1.5 95% IC 17.0- 19.2, values considered effective in relation to the CLSI pattern (>12 mm) but do not exceed the azithromycin zone of inhibition (28.5 mm SD:  $\pm$  1.0 95% IC 27.8 - 29.2). The ANOVA statistical analysis indicated that the study results were highly significant ( $p = 0.000$ ), and Tukey-test showed that the evaluated groups were homogeneous and the azithromycin group had a greater antibacterial effect. It is observed that the higher the concentration of ethanol extract of *Bixa orellana* L. leaf, the greater the zone of inhibition. It is concluded that ethanol extract of *Bixa orellana* L. leaf had antibacterial effect on strains of *Salmonella typhi* ATCC 167, but less than azithromycin, such that it can be used as a complementary medicine in the treatment of *Salmonella typhi*.


**Keywords:** Ethanol extract, *Bixa orellana* L., *Salmonella typhi*, antibacterial effect.

CAMPUS TRUJILLO  
Av. Larco 1770.  
Tel.: (044) 485 000. Anx.: 7000.  
Fax: (044) 485 019.

fb/ucv.peru  
@ucv\_peru  
#saliradelante  
ucv.edu.pe

This document has been translated by the Translation and Interpreting Service of Cesar Vallejo University and it has been revised by the English native speaker: Mark Stables.



  
Mg. Ana Gonzales Castañeda  
Lecturer of the School of Languages

EVALUACIÓN DEL INFORME DE TESIS (ENFOQUE CUANTITATIVO)

**FACULTAD: CIENCIAS MÉDICAS**

**ESCUELA: MEDICINA**

**ALUMNO: CÉSAR AUGUSTO GALVÁN ESTACIO**

**FECHA: 26/02/2019**

**TEMA: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRÁCTO ETANÓLICO DE LA HOJA DE *Bixa Orellana* L. SOBRE *Salmonella typhi* ATCC 167 COMPARADO CON AZITROMICINA**

INDICADORES	NIVEL MÁXIMO POSIBLE	NIVEL EFECTIVO LOGRADO O POR JORNADA	NIVEL EFECTIVO LOGRADO POR JORNADA
<b>1. TÍTULO</b>			
1.1. El título contiene las variables del problema de investigación e informa adecuadamente el contenido del trabajo.	2		
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>			
2.1. Presenta antecedentes sustentados con fuentes confiables y congruentes con el problema de investigación.	2		
2.2. Desarrolla la fundamentación científica, técnica y humanística (marco teórico) de la investigación organizado en base a fuentes actuales vinculadas directamente con las variables del problema de investigación	2		
2.3. Justifica la pertinencia científico-tecnológica y relevancia de la investigación.	2		
2.4. El problema está claramente contextualizado, delimitado y caracterizado	2		
2.5. El problema está formulado en forma clara, concreta y precisa, e incluye explícitamente las variables a trabajar. *	2		
2.6. Los objetivos se relacionan directamente con la formulación del problema.	2		
<b>3. MARCO METODOLOGICO</b>			
3.1. La hipótesis se relaciona con los objetivos y es verificable.	2		
3.2. Identifica de manera clara y precisa las variables de estudio.	2		
3.3. Define teóricamente las variables de estudio	2		
3.4. Operacionaliza las variables adecuadamente	3		
3.5. Los indicadores se derivan de la definición teórica de las variables.	3		
3.6. Selecciona adecuadamente el tipo de estudio y diseño de investigación.	2		
3.7. Establece la población y la muestra de acuerdo a la naturaleza y carácter del estudio.	2		
3.8. Selecciona técnicas adecuadas a la naturaleza del estudio.	2		
3.8. Selecciona y /o elabora el/los instrumento(s) que le permitan recoger los datos relacionados con las variables e indicadores del estudio.	2		
3.10. De ser necesario, realiza correctamente la validación de su instrumento	2		
3.11. Selecciona los métodos estadísticos adecuados para el análisis de información	2		
<b>4. RESULTADOS</b>			
4.1. Procesa los resultados elaborando cuadros y/o gráficos estadísticos.	4		
4.2. Ordena los cuadros de resultados de acuerdo a sus objetivos específicos	3		
4.3. Interpreta adecuadamente los resultados	4		
<b>5. DISCUSION DE RESULTADOS</b>			
5.1. Elabora un análisis minucioso de los resultados tomando en cuenta los	5		

antecedentes y el marco teórico.		
<b>6. CONCLUSIONES</b>		
6.1. Las conclusiones se derivan directamente de los objetivos y/o hipótesis	4	
<b>7. RECOMENDACIONES</b>		
7.1. Las recomendaciones son pertinentes a las conclusiones planteadas.	3	
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>		
8.1. La bibliografía deben contener las referencias señaladas al interior del documento.	2	
8.2. Cita correctamente las fuentes revisadas en base a las Normas Internacionales correspondientes	2	
<b>9. DE LA SUSTENTACIÓN</b>		
9.1. Elabora adecuadamente las diapositivas para su exposición.	3	
9.2. Revela conocer el contenido de su tema de investigación.	9	
9.3. Demuestra conocimiento y entrenamiento en el manejo y empleo del método Científico	10	
9.4. Utiliza los términos con propiedad, sigue las normas de la sintaxis.	7	
9.5. Frente a preguntas sobre temas nuevos que se le plantea, responde con propiedad y se deja entender claramente.	6	
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	

**Escala de conversión del Puntaje a Escala vigesimal:**

<b>PUNTAJE</b>	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32
<b>NOTA</b>	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2	2.4	2.8	3.2	3.6	4	4.4	4.8	5.2	5.6	6	6.4

<b>PUNTAJE</b>	34	36	38	40	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60	62	64	66
<b>NOTA</b>	6.8	7.2	7.6	8	8.4	8.8	9.2	9.6	10	10.4	10.8	11.2	11.6	12	12.4	12.8	13.2

<b>PUNTAJE</b>	68	70	72	74	76	78	80	82	84	86	88	90	92	94	96	98	100
<b>NOTA</b>	13.6	14	14.4	14.8	15.2	15.6	16	16.4	16.8	17.2	17.6	18	18.4	18.8	19.2	19.6	20

.....  
PRESIDENTE

.....  
SECRETARIO

.....  
VOCAL

**Nota:** En la Jornada de Investigación Nº 1, el informe se evaluará **hasta el ítem 4.3**, más la sustentación con los ítems **9.1 a 9.5**. Se consideran **HABILITADOS** los estudiantes que obtengan puntaje igual o mayor a 44.1, En esta Jornada el puntaje de los ítems 9.1 a 9.5 solo es **REFERENCIAL**. El puntaje obtenido se guardará para considerarlo en la Jornada Nº 2. En la Jornada Nº 1, el Jurado estará conformado por el **Docente de la experiencia curricular**. En la Jornada Nº 2, se continúa la evaluación desde el **ítem 5.1 hasta el 9.5**. Para efecto de la nota final se considera lo siguiente:  
Puntaje obtenido en los ítems 1.1 hasta 4.3 + puntaje de los ítems 5.1 hasta 9.5  
En la Jornada Nº 2, el Jurado estará conformado por tres docentes: un metodólogo y dos especialistas.



El que suscribe MGTR. DAVID RENÉ RODRÍGUEZ DÍAZ, Docente de la Facultad de Ciencias Médicas, Escuela Académico Profesional de Medicina.

CERTIFICA:

Que, de conformidad con el Reglamento para elaboración y evaluación de Informes de Tesis para obtener el Título Profesional Médico Cirujano, del alumno: CÉSAR AUGUSTO GALVÁN ESTACIO, de esta casa de estudios, está trabajando bajo mi asesoramiento la Tesis titulada:

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA HOJA DE *Bixa orellana* L. SOBRE *Salmonella typhi* ATCC 167 COMPARADO CON AZITROMICINA, Que será presentado para optar el Título anteriormente mencionado.

En tal virtud, asumo el asesoramiento de dicho proyecto, en calidad de Asesor Metodológico, tarea voluntaria y de cooperación académica con la Escuela de Medicina.

Expedido el presente a solicitud de la parte interesada para los fines académicos que estime conveniente, la Ciudad de Trujillo a los 15 días del mes de Febrero del 2019

---

MGTR. DAVID RENÉ RODRÍGUEZ DÍAZ

CMP 46557



El que suscribe MGTR. JAIME ABELARDO POLO GAMBOA, Docente de la Facultad de Ciencias Médicas, Escuela Académico Profesional de Medicina.

CERTIFICA:

Que, de conformidad con el Reglamento para elaboración y evaluación de Informes de Tesis para obtener el Título Profesional Médico Cirujano, del alumno: CÉSAR AUGUSTO GALVÁN ESTACIO, de esta casa de estudios, está trabajando bajo mi asesoramiento la Tesis titulada:

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA HOJA DE *Bixa orellana* L. SOBRE *Salmonella typhi* ATCC 167 COMPARADO CON AZITROMICINA, Que será presentado para optar el Título anteriormente mencionado.

En tal virtud, asumo el asesoramiento de dicho proyecto, en calidad de Asesor Técnico, tarea voluntaria y de cooperación académica con la Escuela de Medicina.

Expedido el presente a solicitud de la parte interesada para los fines académicos que estime conveniente, la Ciudad de Trujillo a los 15 días del mes de Febrero del 2019

---

MGTR. JAIME ABELARDO POLO GAMBOA

CBP 6951